

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 20120051302096

UDC \_\_\_\_\_

厦门大学

硕士学位论文

# HPV16 主要衣壳蛋白 L1 与 hnRNP H1 的相互作用及其功能

Interaction of Human Papillomavirus 16 Major Capsid Protein  
L1 with hnRNP H1 and its functions

孙媛媛

指导教师姓名: 张 军 教授

专 业 名 称 : 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2008 年 6 月 30 日

论文答辩日期: 2008 年 7 月 29 日

学位授予日期: 2008 年 月 日

答辩委员会主席: 曾定 教授

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2008 年 6 月

---

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（        ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（        ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

---

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为( )课题(组)的研究成果,获得( )课题(组)经费或实验室的资助,在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):  
年 月 日

## 目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
缩略词.....	5
前言.....	7
<b>1. HPV 概况</b> .....	7
1.1. HPV 病理学研究.....	7
1.2. HPV在不同年龄段人群中的易感性.....	8
<b>2. HPV基因组与结构</b> .....	9
2.1. HPV的基因组.....	9
2.2 HPV 病毒的结构.....	11
<b>3. HPV 感染及增殖的分子生物学研究进展</b> .....	12
3.1.病毒与受体结合.....	12
3.2. 病毒的入胞与基因的运输.....	12
3.3. HPV生活史.....	13
<b>4. HPV 晚期基因转录后水平调控</b> .....	14
4.1 HPV蛋白表达调控的意义.....	14
4.2. poly A signal.....	15
4.3. 3'-UTR.....	17
<b>5. hnRNP H1蛋白生物学功能及与HPV的关系</b> .....	19
5.1. hnRNP 蛋白家族的主要功能.....	19
5.2. hnRNP H1/H' 与HPV蛋白表达调控的关系.....	19
<b>6. 相关实验方法</b> .....	21
6.1. 筛选相互作用蛋白的方法.....	21
6.2. 双向凝胶电泳.....	22
6.3. 基体辅助激光解吸电离飞行时间质谱.....	23
6.4 RNA 干扰技术.....	24

7.本论文研究目的与意义.....	27
材料与方法.....	28
1. 材 料.....	28
2. 方法.....	36
结果与分析.....	47
第一部分：免疫沉淀法获取 HPV16 VLPs 结合蛋白方法的建立及初步验证	
1. 免疫沉淀法获取 HPV16 L1 相互作用蛋白.....	47
1.1. HPV VLPs 的构建.....	47
1.2. 原核表达的 HPV16 VLPs 可以进入 HeLa 细胞.....	47
1.3. 免疫沉淀法获取及鉴定 HPV 16L1 相互作用的胞内蛋白.....	48
1.4. MALDI-TOF-MS 鉴定与 HPV16 L1 相互作用的蛋白.....	49
2. hnRNP H1 与 HPV 16L1 的相互作用验证.....	50
2.1. hnRNP H1 真核表达质粒的构建.....	50
2.2. 体内共沉淀验证 HPV16 L1 与 H1 蛋白的相互作用.....	51
2.3. hnRNP H1 与 HPV16 L1 在细胞内的共定位.....	52
3. 第一部分小结.....	53
第二部分：hnRNP H1 在病毒转录调控中的作用	
4. HPV16 转录后调控模型的建立.....	55
4.1. 质粒的构建.....	55
4.2. hnRNP H1 参与的转录终止模型的验证.....	59
5. HPV16 L1 蛋白的表达对 HPV 转录模型的影响.....	63
5.1. 荧光显微镜及流式细胞技术检测 GPG 的表达受 L1 蛋白的影响.....	63
5.2. RT-PCR 检测 16L1 蛋白的表达对 pGPG 转录的影响.....	65
5.3. Western blot 检测 16L1 蛋白的表达对 pGPG 表达的影响.....	66
5.4. HPV16 L1 蛋白对 pGPG 转录产生的 mRNA 稳定性的影响.....	66
5.5. hnRNP H1 基因沉默后 HPV16 L1 对转录通读的影响.....	67
6 第二部分小结.....	68

讨论.....	70
小结与展望.....	76
参考文献.....	78
致谢.....	86
附录.....	87

## Content

<b>Abstract in Chinese</b> .....	1
<b>Abstract in English</b> .....	3
<b>Abbreviation</b> .....	5
<b>Preface</b> .....	7
<b>1. Survey of HPV</b> .....	7
1.1. Pathogenesis of HPV.....	7
1.2. Infectivity of HPV at different ages.....	8
<b>2. HPV genome and structure</b> .....	9
2.1. HPV genome.....	9
2.2 Structure of HPV.....	11
<b>3. Surveys of the development in HPV infection and proliferation</b> .....	12
3.1. Binding of virus and cell receptor.....	12
3.2. Virus entry and genome transportation.....	12
3.3. HPV life cycle.....	13
<b>4. Post-transcriptional regulation of late gene expression</b> .....	14
4.1 Importance of the regulation of protein expression.....	14
4.2. poly A signal.....	15
4.3. 3'-UTR.....	17
<b>5. Biological function of hnRNP H1 and its relationship with HPV</b> .....	19
5.1. Function of hnRNP protein family.....	19
5.2. Relationship between hnRNP H1 and modulation of HPV protein expression.....	19
<b>6. Relevant experiment methods</b> .....	21
6.1. Method for protein interaction scanning.....	21
6.2. Two dimensional gel electrophoresis.....	22
6.3. Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS.....	23
6.4 RNA interference.....	24
<b>7. Aim and meanings of this dissertation</b> .....	27
<b>Materials and Methods</b> .....	28

<b>1. Materials.....</b>	<b>28</b>
<b>2. Methods.....</b>	<b>36</b>
<b>Results and Analysis.....</b>	<b>47</b>
<b>Part I: The foundation of the HPV16 VLPs-interaction protein acquisition based on co-immunoprecipitation</b>	
<b>1. Acquisition of the protein bind to HPV16 L1 with co-immunoprecipitation.....</b>	<b>47</b>
1.1. Construction of HPV VLPs.....	47
1.2. Invasion of procaryotically expressed HPV16 VLPs in HeLa.....	47
1.3. Isolation of HPV 16L1 interacted protein in host cells.....	48
1.4. Identification of the unknown protein.....	49
<b>2. Verification of the interaction between hnRNP H1and HPV 16L1.....</b>	<b>50</b>
2.1. Construction of eukaryotic expression plasmid.....	50
2.2. Confirmation of the interaction between hnRNP H1and HPV 16L1 with in vivo co-immunoprecipitation.....	51
2.3. Co-location of hnRNP H1 and HPV16 L1.....	52
<b>3. Summary.....</b>	<b>53</b>
<b>Part II: The hnRNP H1 functioned in HPV post-transcriptional regulation</b>	
<b>4. The foundation of HPV16 post-transcriptional regulation model.....</b>	<b>55</b>
4.1. Construction of the plasmids.....	55
4.2. Validation of the transcription termination model combined with hnRNP H1.....	59
<b>5. The effect of HPV16 L1 in HPV transcription model .....</b>	<b>63</b>
5.1. Fluorescent microscope and flow cytometry analysis of the GPG expression affected by 16L1 .....	63
5.2. RT-PCR detection of GPG expression affected by 16L1 .....	65
5.3. Western blot analysis of GPG expression affected by 16L1 .....	66
5.4. Stability assay of the transcripts of pGPG.....	66
5.5. The effect of 16L1 on read-through efficiency in hnRNP H1 silenced cells.....	67
<b>6 Summary.....</b>	<b>68</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>70</b>
<b>Summary and prospect.....</b>	<b>76</b>
<b>References.....</b>	<b>78</b>



<b>Acknowledgement</b> .....	86
<b>Appendix</b> .....	87

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘 要

流行病学和相关研究证实人乳头瘤病毒(HPV)感染与尖锐湿疣、宫颈上皮瘤样增生和宫颈癌的发生关系密切。HPV 感染机体后各种病毒基因的表达是受严格调控的,尤其是晚期基因,在未分化的细胞中几乎不表达,随着细胞分裂,病毒基因组随子细胞上移到表皮上层后,晚期蛋白的表达才被启动。这种分化依赖的晚期蛋白表达调控机制尚不明确。

在以往的研究中发现,晚期蛋白在转录后水平受多种负调节元件的控制,其中早期多聚腺苷酸化信号(pAE)在晚期基因的转录后调控中起到核心的作用,它能使 mRNA 的转录提前终止,在 HPV16 L2 的 N 端有一个 GU 含量丰富的序列(GU-rich sequence, GRS),是 hnRNP H1 蛋白结合位点,能够增强 pAE 的活性,进一步抑制晚期蛋白的表达。hnRNPH1 在细胞中的分布水平有随着细胞的分化而降低的特点,晚期蛋白表达的组织特异性很可能与 hnRNP H1 的表达有关。

我们用免疫共沉淀技术发现 hnRNP H1 与 HPV16 L1 蛋白有相互作用,并证实这种相互作用是天然状态下存在的。我们构建了一个模拟 HPV 转录调控的质粒模型(pGPG),用两个 GFP 分别代替早期基因和晚期基因,中间加以 pAE 和下游的 GRS 序列。通过检测下游的 GFP(G2)的 RNA 以及蛋白质的表达,来反映 hnRNP H1 蛋白及 L1 对晚期蛋白转录翻译的影响。在 293FT 细胞中转染 pGPG 质粒,几乎检测不到 G2 的转录产物,蛋白表达量也很低,沉默 hnRNP H1 基因后,G2 的转录和表达量大大提高,印证了 hnRNP H1 对晚期蛋白的转录抑制效应起重要作用。我们首次发现:HPV16 L1 的表达能够有效地提高 G2 的转录和蛋白表达水平,在 HeLa 和 Huh7 等细胞上也发现相同的现象,将 hnRNP H1 沉默后再转染 HPV16 L1 质粒,发现在没有 H1 的情况下,L1 对 G2 的表达没有额外的刺激效应。提示 HPV16 L1 对晚期蛋白表达的提高可能是通过 L1 与 hnRNP H1 结合,抑制了 hnRNP H1 的功能来实现的。在病毒的感染过程中,L1 蛋白很可能参与了晚期基因的转录后调控,对自身的表达有正协同的效应。L1 与 hnRNP H1 相互阻遏,hnRNP H1 表达过高时 L1 的表达被抑制,在分化的细胞中 hnRNP H1 的表达量降低,pAE 活性不高,晚期基因可以通读、表达,随着 L1 蛋白表达量增多并结合到 hnRNP H1 上,hnRNP H1 失活,最终 L1 蛋白得以大量表达,启动病毒成熟的后续过程。本文章为更进一步揭示 HPV 晚期蛋白的表达和病毒

生活周期的调控规律提供了一些思路，为 HPV 引发的多种疾病的致病机理提供理论支持，并为相关治疗药物的研发提供有利的启示。

**关键词：**人乳头瘤病毒；核糖核蛋白；转录后调控

厦门大学博硕士论文摘要库

## Abstract

It has been confirmed that the infection of HPV is associated with genital warts and various forms of cancer in men and women. Expression of viral gene, especially the late gene, is tightly controlled while these late gene will not expressed in less differentiated cells. Along with cell division, viral genome move upward to the most superficial epithelium layer, and that initiate the late gene expression. However the mechanism of differentiation dependent late gene expression is not totally clear.

The expression of the late genes is negatively regulated by various factors at the post-transcriptional level. The most key point is the early polyadenylated signal (pAE), which can prevent virus from reading-through into the late region. A GU-rich sequence (GRS) was found downstream of the pAE in HPV16 L2 gene which is also a binding site of hnRNP H1. The binding can enhance the efficiency of pAE and down-regulate the expression of the late gene. It was noticed that in cervical epithelia the expression of hnRNP H1 is gradually declined with the differentiation of the cells. It may be an explanation of why the late gene expression acts in a differentiation-dependent manner.

We found an natively existed interaction between HPV16 L1 and hnRNP H1 with co-immunoprecipitation. A plasmid pGPG has been constructed to simulate the transcriptional regulation of papillomavirus. We used two GFP genes to stand for the early and late gene, and inserted the pAE and GRS between them. Assessment of the expression of downstream GFP (G2) could figure out the effects of hnRNP H1 and HPV16 L1 in the late gene expression. 293FT cells were transfected with pGPG, and hardly any G2 mRNA and protein could be detected. After silencing the hnRNP H1 gene in 293FT the G2 expression level became high and that supported the view hnRNP H1 plays an important role in down-regulating the late gene expression. We primarily found that HPV16 L1 protein could largely activate the G2 expression. Similar results were also observed in HeLa and Huh7 cells. While L1 in the hnRNP H1 absent cells couldn't bring about extra effects on G2 expression compared with L1 negative cells. It is suspected that HPV16 L1 could increase the late gene expression in our model. The mechanism might lie in the interaction between hnRNP H1 and L1 which inhibit the function of H1 protein. L1 might participate in the regulation of late gene expression in the course of HPV

infection, and have a positive synergistic effect on the expression of itself. On the other hand, L1 and hnRNP H1 repress each other. When the expression of hnRNP H1 increases, the late gene expression will be inhibited. Whereas in the terminally differentiated cells, the level of hnRNP H1 was too much lower for pAE to function well. This caused the reading-through of the late region, followed by production of the late mRNAs encoding L1 and L2. More and more L1 protein bind to hnRNP H1 and break the balance between them which make even more late gene products and initiate some other processes impelling the maturation of virus. We hope our research could provide a clue for further understanding of the mechanism about HPV late protein expression and virus life cycle, and provide more experimental supports for interpreting the pathogenesis of HPV induced diseases, which might contribute to successful drug design of these diseases.

**Key words:** HPV; hnRNP H1; post-transcriptional regulation

## ABBREVIATION (缩略词)

2-DE: two dimensional gel electrophoresis, 双向凝胶电泳

3'-UTR: 3'-Untranslated Region, 3'-非翻译区

Amp: Ampicillin, 氨苄青霉素

AREs: AU-rich elements, AU-rich 元件

bp: base pair, 碱基对

BPV: Bovine Papillomavirus, 牛乳头瘤病毒

CBP: calmodulin- binding peptide, 钙调蛋白结合肽

CIN: Cervical Intraepithelial Neoplasia, 宫颈上皮内瘤样病变

CPSF: cleavage/polyadenylation specificity factor, 剪切/多聚腺苷酸化特异性因子

CstF: Cleavage stimulation factor, 剪切刺激因子

DNA: Deoxyribonucleic Acid, 脱氧核糖核酸

EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein, 增强型绿色荧光蛋白

FBS: Fetal Bovine Serum, 胎牛血清

FCM: Flow Cytometry, 流式细胞仪

G3PDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 甘油-3-磷酸脱氢酶的同工酶

GFP: Green Fluorescent Protein, 增强型绿色荧光蛋白

GRS: Guanine Rich Sequence, 富含鸟嘌呤的序列

HIV: Human Immunodeficiency Virus, 人免疫缺陷病毒

hnRNP: heterogeneous ribonucleoproteins, 异质性核糖核蛋白

HPV: Human Papillomavirus, 人乳头瘤病毒

HSPG: Heparan Sulfate Proteoglycan, 硫酸乙酰肝素蛋白聚糖

IEF: isoelectric focusing electrophoresis, 等电聚焦电泳

Kan: Kanamycin, 卡那霉素

kb: kilo base pair, 千碱基对

kD: kilo Daltons, 千道尔顿

LCR: Long Control Region, 长控制区

mAb: monoclonal antibody, 单克隆抗体

MALDI-TOF-MS: Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, 基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱

MW: Molecular Weight, 分子量

NHANES: National Health and Nutrition Examination Survey, 全国健康和营养调查

NLS: nuclear localization signal, 核定位信号

ORF: Open Reading Frame, 开放阅读框

Ori: Origin, 复制起始位点

pAE : early polyadenylated signal, 早期多聚腺苷酸化信号

PTB: polypyrimidine tract binding protein, 多聚尿嘧啶结合蛋白

PV: Papillomavirus, 乳头瘤病毒

RNA: Ribonucleic Acid, 核糖核酸

RNAi : RNA interference, RNA 干扰

RRE : REV response element, REV 反应元件

siRNA: small interfering RNA, 小干扰性 RNA

SV40: Simian vacuolating virus, 猿空泡病毒 40

URR: Upstream Regulatory Region, 上游调节区

VLP: Virus-like Particle, 病毒样颗粒

## 前 言

### 1. HPV 概况

#### 1.1. HPV病理学研究

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一种无包膜双链 DNA 病毒, 现已发现的型别有 120 多个。其中 40% 以上的型别能够感染肛门与生殖器的上皮组织。依据致癌性可以将 HPV 病毒分为低危型和高危型。低危型主要引起皮肤粘膜组织的良性病变。所有的生殖器疣都是 HPV 病毒感染引起的, 其中 90% 是由 HPV6、11 引起; 高危型会引起宫颈癌、生殖器外生殖器癌症和复发性呼吸道乳头状瘤疾病, 在 99.7% 的宫颈癌等病灶中发现有 HPV 病毒粒子, 其中 70% 是 HPV16、18 等, 它们的感染是宫颈癌发病的必要条件<sup>[1, 2]</sup>。宫颈癌是全球女性第二大肿瘤, 每年约有 51 万新诊断的宫颈癌患者, 并且有 28.8 万人死于宫颈癌。可见 HPV 已经成为人类尤其是女性健康的重大威胁。

大多数感染 HPV 的个体短期内有症状或者不发病, 在被感染病例中有 70% 一年内病毒被完全清除, 90% 在两年内被清除。在美国高校女生中的调查显示, HPV 病毒被清除的平均时间为 8 个月<sup>[3, 4]</sup>。可见大多数情况下, 病毒呈隐形感染, 然而也有少部分病毒在体内长期潜伏并最终诱发癌症, 宫颈癌潜伏期可达 12-15 年。

HPV 感染宫颈后要经过多年的一系列的病变才能发展为恶性的宫颈癌。病变的程度由鳞状上皮被基底癌细胞替代的程度确定, 传统的分类为宫颈上皮内瘤样病变(cervical intraepithelial neoplasia, CIN) I、II 和 III, 描述轻微、中度和严重病变; 另一种分类方法将鳞状上皮内损伤(Squamous Intraepithelial Lesion, SIL)分为低度和高度(LSIL and HSIL), CIN II/III 和 SIL 高级是发生宫颈癌的前兆。

部分 HPV 感染者会出现不同程度的组织病理学改变(宫颈鳞状上皮病变, CIN), 根据病变程度分为 1~3 级或原位癌。CIN1~CIN3 病变都可能自发消除。大多数(>60%) 的 CIN1 会自发消除, 极少数会进展到癌变(1%); 约 30%~40% 的 CIN2 和 CIN3 可自发消除, 但若未经治疗有较大比例(>12%) 会发展为癌症。HPV 16 和 18 在较高级别病理病变中更为常见。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库